

ПРОБЛЕМА КОНТАМИНАЦИИ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ ИНКУБАТОРОВ В ЭКО ЛАБОРАТОРИИ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНТАМИНИРУЮЩЕГО АГЕНТА И РАЗРАБОТКА РУТИННОГО АЛГОРИТМА ОБРАБОТКИ CO₂-ИНКУБАТОРОВ

Бозина Я.В.¹, Апрышко В.П.^{1,3}, Страшнова А.Л.¹, Мухортова А.А.³, Болт А.И.¹, Бирюков А.А.¹,

Воронич Н.С.¹, Кириенко К.В.¹, Яковенко С.А.^{1,2}

1. ЭКО центр, клиника «Альтравита», Москва.

2. МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, Москва.

3. МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва



АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

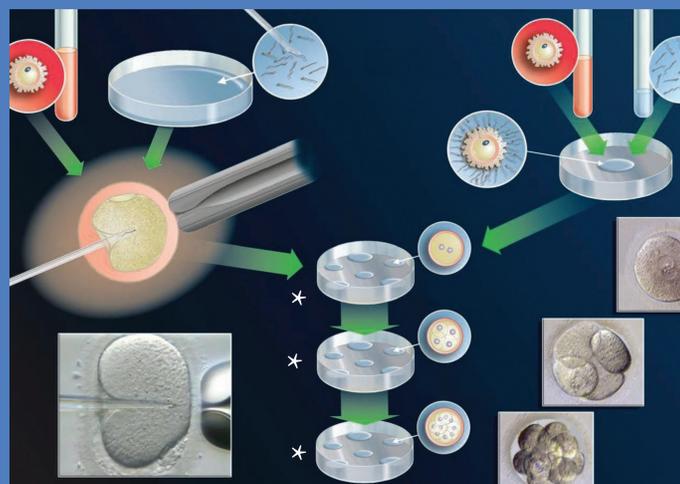
Контаминация CO₂-инкубаторов микрофлорой — одна из важных проблем, возникающих в лабораториях, работающих с культурами клеток. Повышенная влажность и температура являются благоприятными условиями для активного роста микробиоты.

Для культивирования эмбрионов человека *in vitro* лаборатории используют CO₂-инкубаторы с водяной рубашкой. Внутри инкубатора поддерживаются следующие физические параметры: влажность 95-100%, температура 37°C и воздушная среда содержащая 5-7% углекислого газа. Данные условия являются стимулирующим фактором для роста и распространения микробиоты на внутренних поверхностях инкубаторов. Разработка эффективной и безопасной стратегии по борьбе с контаминацией является одной из важнейших проблем ЭКО лабораторий.

Согласно литературным данным, основными видами-контаминантами влажных CO₂-инкубаторов являются *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* и *Paecilomyces variotii*. Известно, что токсичные метаболиты, выделяемые плесневыми грибами, вызывают различные повреждения клеточных культур. Было отмечено, что афлатоксины *Aspergillus spp.* даже в минимальных концентрациях ингибируют синтез белка и ДНК, снижают митотическую активность, приводя тем самым к подавлению клеточного роста. Хотя какое-либо влияние метаболитов *P. variotii* на человеческие эмбрионы не доказано, оно является вероятным. Кроме того, продукты метаболизма *P. variotii* вызывают коррозию металлов.

Существующие методы дезинфекции оказываются либо неэффективны для уничтожения микотической контаминации, либо неприемлемы для использования при обработке CO₂-инкубаторов или недопустимы при работе с клеточными культурами из-за высокой токсичности и/или агрессивности. Регулярная обработка 70% раствором этилового спирта все еще остается единственным оптимальным методом деконтаминации.

ЭКОИКСИ. * ЭТАПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ ДО СТАДИИ БЛАСТОЦИСТЫ ПРОХОДЯТ В CO₂-ИНКУБАТОРАХ



ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ: ВЫЯВИТЬ НАЛИЧИЕ КОНТАМИНАЦИИ, ОПРЕДЕЛИТЬ ВИДОВУЮ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ КОНТАМИНИРУЮЩЕГО АГЕНТА, РАЗРАБОТАТЬ АЛГОРИТМ ОБРАБОТКИ CO₂-ИНКУБАТОРА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В одной из эмбриологических лабораторий г. Москвы, было проведено исследование введенных в эксплуатацию инкубаторов на предмет наличия заражения микромицетами. Проведено определение видовой принадлежности полученных образцов, выявлены источники контаминации и проведена оценка эффективности дезинфекции.

Для определения видовой принадлежности контаминирующей микрофлоры были собраны поверхностные образцы из 24 эксплуатируемых инкубаторов **Thermo Scientific Series 8000 WJ CO₂ Incubator**.

Для установления возможного источника контаминации, на наличие микроорганизмов были протестированы упаковки, полки, стеклянные дверцы и стенки 8 новых (не введенных в эксплуатацию) CO₂-инкубаторов. Также был проанализирован аспирационным методом воздух в лаборатории с помощью прибора Кротова, исследованы смывы с рук сотрудников, взяты пробы воды из водяной рубашки 24 эксплуатируемых инкубаторов.

Для определения вида и концентрации микроорганизмов, образцы отправляли в лабораторию Альгологии и Микологии (Биол. Факультет МГУ). Видовую принадлежность определяли по Domsch K. H. et al, 2007.

Для установления скорости роста *P. Variotii* и определения необходимой частоты деконтаминации инкубаторов применяли метод бакпечаток. Использовались бакпечатки **HiTouchFlexiPlate (Himedia laboratories, Индия)** с селективными микотическими средами (FL006, FL009, FL010, FL011). Пробы брали со стенок и полок инкубаторов (посевы в четырех повторах с каждой точки отбора) в день обработки (день 0) и затем через 5, 10, 15, 20, 25, 30 дней после нее. Инкубаторы обрабатывали в соответствии с условиями асептики и рекомендациями производителя 70%-ным раствором этилового спирта и дистиллированной водой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате микробиологического анализа внутренних поверхностей 24 эксплуатируемых инкубаторов был обнаружен плесневый гриб *Paecilomyces variotii* Bainier в качестве единственного контаминанта.

Исследование частей и бумажной упаковки 8 новых (неэксплуатируемых) инкубаторов выявило 6 видов плесневых грибов: *Neurospora crassa*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger* Tiegh., а также *Paecilomyces variotii* Bainier.

Из водяной рубашки 24 эксплуатируемых инкубаторов был выделен только один бактериальный вид, его определение не проводилось. Грибов выделено не было.

Воздух в помещении отдела эмбриологии соответствовал стандартам для лабораторий класса В. Сотрудники лаборатории как источник загрязнения инкубаторов были исключены, так как в лаборатории соблюдались методы асептики и антисептики, а также меры по профилактике контаминации. Контролирующие органы Росздравнадзора регулярно исследуют смывы с рук сотрудников лаборатории.

Наибольшее число КОЕ/см² обнаружено при инкубировании на среде **FL010**, богатой по составу и содержащей в 50 раз больше декстрозы, чем другие среды (Табл.2).



Бакпечатки **HiTouchFlexiPlate (Himedia laboratories, Индия)** с селективными микотическими средами (FL006, FL009, FL010, FL011)

По результатам проведенного анализа на 0,5, 10 день после деконтаминации инкубаторов *Paecilomyces variotii* не высевается. Рост колоний выявлялся с 15-го дня (на 15, 20, 25, 30 день после обработки).

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ДЕЗИНФЕКЦИИ

Дезинфектант	Ограничения
Мыльный раствор	Неэффективен против многих контаминантов
Biocidal ZF	Содержит хлорид бензалкония, его контакт с гиалуронатом в составе питательных сред недопустим. Кроме того, производителем запрещено использование хлорных соединений при дезинфекции инкубатора.
Дезинфектанты, содержащие хлор	Производителем запрещено использование хлорных соединений при дезинфекции инкубатора. Крайне опасен для эмбрионов
Спирт	Крайне опасен для эмбрионов
Формальдегид	Крайне опасен для эмбрионов

Мицелий *P. Variotii*.

Обработка инкубатора 70% раствором этилового спирта.



Таблица 1. Число КОЕ/25 см² и КОЕ/см² в зависимости от среды культивирования

Среда	Число бакпечаток	Число КОЕ	Число КОЕ на бакпечатку (25 см ²)	Число КОЕ/см ²
FL006	43	301	7,00	0,28
FL009	47	317	6,74	0,27
FL010	44	578	13,14	0,53
FL011	44	382	8,68	0,35

Таблица 2. Состав среды FL010 (pH (при 25°C) 4,6 ± 0,2).

Компонент среды	Грамм/л
Биопептон	10,00
Дрожжевой экстракт	9,00
Глюкоза	50,00
Сульфат магния	2,10
Дигидроортофосфат калия	2,00
Диастаза	0,05
Гидрохлорид тиамина	0,05
Краситель-индикатор	0,026
Агар	15,00

ВЫВОДЫ

- В ходе исследований в данной лаборатории был выделен единственный контаминант внутренних поверхностей CO₂-инкубаторов - *Paecilomyces variotii*. Видимого негативного влияния данного вида гриба на развитие эмбрионов замечено не было.
- Наиболее вероятным источником контаминации является упаковка и детали новых инкубаторов, с которых был выделен *P. variotii*, наряду с другими плесневыми грибами.
- Согласно данным, полученным в ходе проведенных экспериментов, оптимальной частотой деконтаминации инкубаторов является их обработка один раз в 15 дней.

Таким образом, рекомендуется непосредственно в каждой лаборатории устанавливать вид контаминирующего агента и разрабатывать индивидуальный режим рутинного обеспечения чистоты инкубаторов. Использование бакпечаток **HiTouch FlexiPlate со средой FL010** может быть оптимальным для этих целей.

Единственным методом борьбы с появлением микрофлоры в инкубаторах для культивирования эмбрионов на сегодняшний день остается физическое удаление мицелия - регулярная обработка 70% раствором этилового спирта и дистиллированной водой. Высокая частота повторного появления заражения указывает на необходимость разработки новых методов дезинфекции инкубаторов при совместном сотрудничестве с фирмами производителями.